

10/518647

证 明

REC'D 31 JUL 2003

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请的副本PCT

申 请 日： 2002 06 19

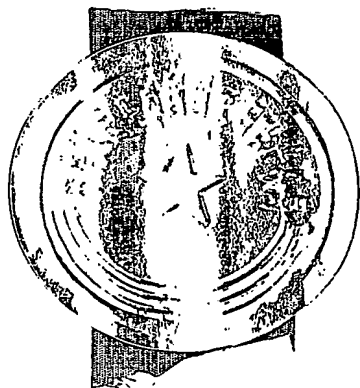
申 请 号： 02 1 22664.4

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 新的N-取代吡啶基苯并异噻唑酮化合物及其制法和其药物组合物与用途

申 请 人： 中国医学科学院药物研究所

发明人或设计人： 郭宗儒； 王晓良； 褚凤鸣； 冯楠



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

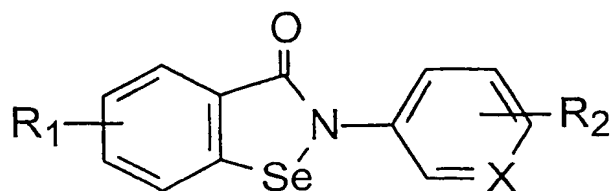
中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 崇 川

2003 年 7 月 14 日

权利要求书

1、如通式(I)所示的化合物，



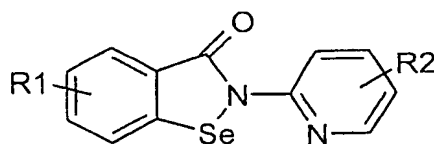
(I)

其特征在于，该通式中 R₁ 选自氢，卤素，C₁-C₄ 的直链或支链烷基或烷氧基；R₁ 的取代位置是 3-、4-、5-或 6-位；

R₂ 选自氢，卤素，C₁-C₄ 的直链或支链烷基或烷氧基；R₂ 的取代位置是 2-位吡啶环上任一碳原子；

X 代表氮原子，其取代位置是 2-，3-或 4-位。

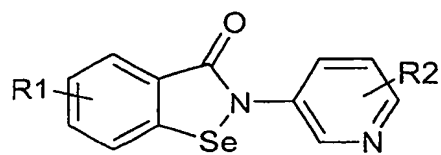
2、根据权利要求 1 的化合物，其特征在于，包括以下如通式 (Ia) 所示的化合物：



(Ia)

其中，R₁ 和 R₂ 的定义同上；

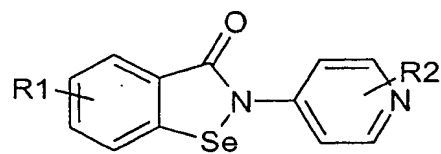
通式 (Ib) 所示的化合物：



(Ib)

R_1 和 R_2 的定义同上;

以及通式 (Ic) 所示的化合物:



(Ic)

其中, R_1 和 R_2 的定义同上。

3、制备如权利要求 1 的化合物的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

取代的邻氨基苯甲酸经重氮化得到的重氮盐与二硒化钠反应, 生成的 2,2'-二硒化双苯甲酸经酰氯化, 与氨基吡啶缩合而得本发明化合物。

4、如权利要求 3 的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(A) 将取代的邻氨基苯甲酸在酸性介质中与亚硝酸盐反应, 得到取代的苯甲酸重氮盐;

(B) 得到的取代的苯甲酸重氮盐与二硒化钠反应, 酸化得到 2,2'-二硒化双苯甲酸;

(C) 得到的 2,2'-二硒化双苯甲酸与二氯亚砷反应, 生成取代的 2-氯硒代苯甲酰氯;

(D) 得到的取代的 2-氯硒代苯甲酰氯在溶剂介质中与各种氨基吡

啉缩合，得到取代的 2-吡啶基-1,2-苯并异噻唑-3(2H)-酮。

7、如权利要求 1—4 任一化合物在制备缺血性心肌损伤药物中的应用。

8、一种抗缺血性心肌损伤的药物组合物，其特征在于含有权利要求 1—4 任一化合物作为活性成分，以及药学上可接受的载体。

9、根据权利要求 7 所述的药物组合物，其特征在所述的药物组合物可以是片剂，胶囊，丸剂或注射剂。

说明书

新的 N-取代吡啶基苯并异噻唑酮化合物及其制法 和其药物组合物与用途

技术领域

本发明涉及新的 N-取代吡啶基苯并异噻唑酮化合物及其制备方法，含有它们的药物组合物，及其作为药物，尤其是作为抗缺血性心肌损伤药物的用途。

背景技术

随着社会生活水平的提高和人口老龄化，心血管疾病，特别是缺血性心肌损伤的发病日益增加，已成为影响中老年人生活质量和寿命的重要因素。现今临床应用的扩张血管的硝酸酯类药物，二氢吡啶类钙通道拮抗剂亦即 β -肾上腺能阻滞剂等均伴随有不良反应，临床应用的选择余地小。

Na^+ - Ca^{2+} 交换蛋白是可兴奋细胞膜上一种重要的双向离子转运蛋白，它的主要功能是排出细胞兴奋过程中进入细胞内的 Ca^{2+} ，使细胞内 Ca^{2+} 恢复到静息状态水平。在每排出 1 个 Ca^{2+} 的同时，转入细胞内 3 个 Na^+ ，因此有一个净电荷的跨膜移动，产生跨膜电流。心肌缺血再灌的初期，细胞膜的损伤导致膜电位异常，膜通透性改变，使大量的 Na^+ 进入细胞，此时 Na^+ - Ca^{2+} 交换反向转运被激活。钠-钙交换是个双向过程，为了排出过多的 Na^+ ，引起细胞内 Ca^{2+} 超载，从而加重细胞的损伤及死亡。这种情况下的反向转运，在病理状态下，会引起严重的不良后果。因而 Na^+ - Ca^{2+} 交换反向转运被认为是缺血/再灌引起严重不良后果的重要机制。国内外至今尚无特异性阻断 Na^+ - Ca^{2+} 交换反向转运的药物。因此，创制对钠-钙交换系统具有特异性阻断作用的药物对治疗缺血性心肌损伤（冠心病），保护心脏具有重要的临床价值。

本发明在研究对 Na^+ - Ca^{2+} 交换阻断剂的过程中发现 N-取代的吡啶基苯并异噻唑酮具有明显的阻滞作用。苯并异噻唑酮是一组模拟谷胱甘肽过氧化物还原酶的合成化合物，有代表性的依布罗啉

(Ebselen)具有抗炎作用，并于临床上用作治疗蛛网膜下出血药物 (Hashizume T and Kato Y. JP 1988027431; Tanaka et al. JP 1989131113; Maruyama I et al. WO 9808511)，但未见关于阻止 Na^+ - Ca^{2+} 交换系统的报道。

发明内容

为了填补现有技术的空白，本发明的目的在于提供一种新的作用于钠-钙交换系统的 N-取代吡啶基苯并异硒唑酮化合物；

本发明的另一目的在于提供一种新的 N-取代吡啶基苯并异硒唑酮化合物的制备方法；

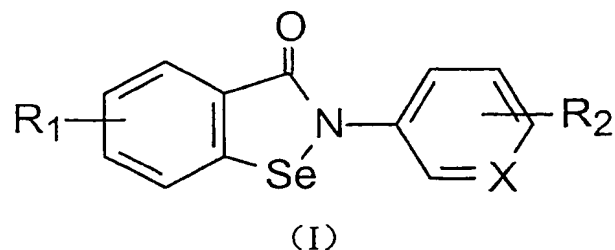
本发明的另一目的在于提供一种新的新的 N-取代吡啶基苯并异硒唑酮化合物及其组合物作为抗缺血性心肌损伤药物的应用。

本发明一方面涉及药物组合物，其包括作为活性成份的通式 (I) 的化合物及其异构体及制药领域中常用的载体。

本发明再一方面涉及的是通式 (I) 化合物或含有它的药物组合物在预防和/或治疗缺血性心肌损伤的用途。

本发明再一方面涉及的是预防和/或治疗缺血性心肌损伤的方法，其包括将通式 (I) 化合物或含有它的药物组合物给药于需预防和/或治疗的宿主。

具体讲，本发明涉及如通式 (I) 所示的化合物。

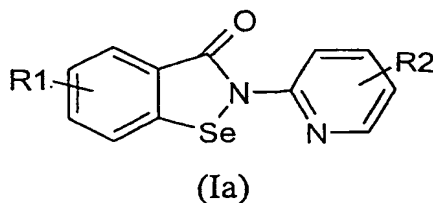


其中， R_1 选自氢，卤素， C_1 - C_4 的直链或支链烷基或烷氧基； R_1 的取代位置是 3-、4-、5-或 6-位。

R_2 选自氢，卤素， C_1 - C_4 的直链或支链烷基或烷氧基； R_2 的取代位置是 2-位吡啶环上任一碳原子。

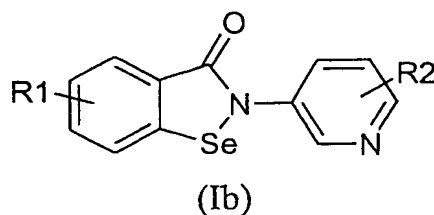
X 代表氮原子，其取代位置是 2-，3-或 4-位。

再具体讲，本发明涉及但不限定如通式（I）的典型代表化合物包括（Ia）所示的化合物，



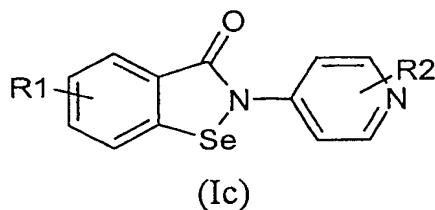
R1 和 R2 的定义同上。

通式（Ib）所示的化合物，



R1 和 R2 的定义同上。

以及通式（Ic）所示的化合物，



R1 和 R2 的定义同上。

为制备本发明通式 I 所述的化合物，本发明方法包括，取代的邻氨基苯甲酸经重氮化得到的重氮盐与二硒化钠反应，生成的 2,2'-二硒化双苯甲酸经酰氯化，与氨基吡啶缩合而得。

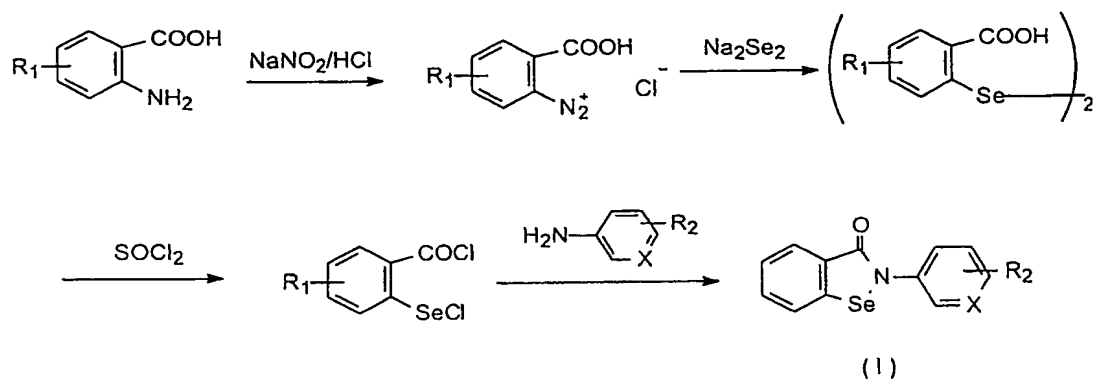
具体地讲，制备通式 I 所述的化合物的方法，包括入下步骤：

（A） 将取代的邻氨基苯甲酸在酸性介质中与亚硝酸盐反应，得到取代的苯甲酸重氮盐；

（B） 得到的取代的苯甲酸重氮盐与二硒化钠反应，酸化得到 2,2'-二硒化双苯甲酸；

(C) 得到的 2,2'-二硒化双苯甲酸与二氯亚砷反应, 生成取代的 2-氯硒代苯甲酰氯;

(D) 得到的取代的 2-氯硒代苯甲酰氯在不同溶剂介质中与各种氨基吡啶缩合, 得到取代的 2-吡啶基-1,2-苯并异硒唑-3(2H)-酮。



本发明因此还涉及含有作为活性成份的有效剂量的至少一种通式 (I) 化合物和/或其立体异构体以及常规药物赋形剂或辅剂的药物组合物。通常本发明药物组合物含有 0.1-90 重量%的通式 (I) 化合物和/或其生理上可接受的盐。

药物组合物可根据本领域已知的方法制备。用于此目的时, 如果需要, 可将通式 (I) 化合物和/或立体异构体与一种或多种固体或液体药物赋形剂和/或辅剂结合, 制成可作为人药或兽药使用的适当的施用形式或剂量形式。

本发明的通式 (I) 化合物或含有它的药物组合物可以单位剂量形式给药, 给药途径可为肠道或非肠道, 如口服、肌肉、皮下、鼻腔、口腔粘膜、皮肤、腹膜或直肠等。给药剂型例如片剂、胶囊、滴丸、气雾剂、丸剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、栓剂、冻干粉针剂等, 可以是普通制剂、缓释制剂、控释制剂及各种微粒给药系统。为了将单位给药剂型制成片剂, 可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是, 例如稀释剂与吸收剂, 如淀粉、糊精、硫酸钙、乳糖、甘露醇、蔗糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、碳酸钙、白陶

土、微晶纤维素、硅酸铝等；湿润剂与粘合剂，如水、甘油、聚乙二醇、乙醇、丙醇、淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、紫胶、甲基纤维素、磷酸钾、聚乙烯吡咯烷酮等；崩解剂，例如干燥淀粉、海藻酸盐、琼脂粉、褐藻淀粉、碳酸氢钠与枸橼酸、碳酸钙、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等；崩解抑制剂，例如蔗糖、三硬脂酸甘油酯、可可脂、氢化油等；吸收促进剂，例如季铵盐、十二烷基硫酸钠等；润滑剂，例如滑石粉、二氧化硅、玉米淀粉、硬脂酸盐、硼酸、液体石蜡、聚乙二醇等。还可以将片剂进一步制成包衣片，例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片，或双层片和多层片。为了将给药单元制成丸剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如葡萄糖、乳糖、淀粉、可可脂、氢化植物油、聚乙烯吡咯烷酮、Gelucire、高岭土、滑石粉等；粘合剂，如阿拉伯胶、黄蓍胶、明胶、乙醇、蜂蜜、液糖、米糊或面糊等；崩解剂，如琼脂粉、干燥淀粉、海藻酸盐、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等。为了将给药单元制成栓剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如聚乙二醇、卵磷脂、可可脂、高级醇、高级醇的酯、明胶、半合成甘油酯等。为了将给药单元制成胶囊，将有效成分通式(I)化合物或其立体异构体与上述的各种载体混合，并将由此得到的混合物置于硬的明胶胶囊或软胶囊中。也可将有效成分通式(I)化合物或其立体异构体制成微囊剂，混悬于水性介质中形成混悬剂，亦可装入硬胶囊中或制成注射剂应用。为了将给药单元制成注射用制剂，如溶液剂、乳剂、冻干粉针剂和混悬剂，可以使用本领域常用的所有稀释剂，例如，水、乙醇、聚乙二醇、1, 3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯等。另外，为了制备等渗注射液，可以向注射用制剂中添加适量的氯化钠、葡萄糖或甘油，此外，还可以添加常规的助溶剂、缓冲剂、pH调节剂等。

此外，如需要，也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂、甜味剂或其它材料。

本发明通式 (I) 化合物或其立体异构体的给药剂量取决于许多因素, 例如所要预防或治疗疾病的性质和严重程度, 患者或动物的性别、年龄、体重及个体反应, 所用的具体化合物, 给药途径及给药次数等。通常对体重约 75 公斤患者, 所给通式 (I) 化合物的日剂量为 0.001mg/kg 体重-100mg/kg 体重, 优选 0.01mg/kg 体重-20mg/kg 体重。上述剂量可以单一剂量形式或分成几个, 例如二、三或四个剂量形式给药。

本发明的化合物经过药理研究: 可见心肌细胞的电生理研究表明本发明化合物对外向 Na-Ca 交换的抑制作用强于内向抑制, 具有特异性。抑制率大于 40%, 最强的接近 60%。

在离体心脏缺血再灌注实验中, 以心律失常的持续时间, 室早, 室速和室颤的发生率作为心肌损伤的指标, 观察化合物的心肌保护作用。结果表明本发明的化合物在浓度为 10^{-6} 时, 有显著心肌保护作用。

静脉注射本发明化合物, 发现能显著性延长麻醉大鼠缺血一再灌注心律失常的潜伏期, 降低 VT 和 VF 的发生率, 缩短 VT 和 VF 的持续时间。说明本发明化合物对冠状动脉缺血再灌注损伤有明显的保护作用。

口服本发明化合物, 以心脏损伤后出现心律失常的程度作为评价指标来观察发现口服 30mg/Kg, 可显著性缩短缺血-再灌注心律失常 ($P < 0.01$) 的持续时间, 降低 VT ($P < 0.01$) 和 VF ($P < 0.05$) 的发生率, 缩短 VT ($P < 0.01$) 的持续时间。口服 100mg/Kg, 可显著性缩短缺血-再灌注心律失常 ($P < 0.05$) 的持续时间, 降低 VT ($P < 0.05$) 的发生率, 缩短 VT ($P < 0.01$) 的持续时间。说明本发明化合物对冠状动脉缺血再灌注损伤有明显的保护作用。

再对本发明化合物的急性毒性实验中各剂量组均未见动物死亡, 半数致死量 $LD_{50} > 5g/kg$, 提示此类化合物毒性较低。

具体实施方式

下面的实施例及药物活性实验用来进一步说明本发明, 但这并不意味着对本发明的任何限制。

在本发明中, 使用的原料为已知化合物或按本领域技术人员公知

的方法制备的化合物。制备虽然不生成本发明的化合物，但是合成制备本通式 (I) 化合物的有用中间体。

步骤 A、B:

实施例 1 2, 2'-二硒化双苯甲酸的制备

硒粉 17.6 g 溶解于含有 8.8 g 氢氧化钠的 120 ml 水溶液，搅拌下加入 17.6 g 雕白粉，室温搅拌 4h，得二硒化钠溶液，备用。

邻氨基苯甲酸 34g(0.248 mol)溶解于 6 N 盐酸 100 ml 中，搅拌下 0—5 °C 滴入含有 18 g 亚硝酸钠的 40 ml 水溶液，搅拌 20 分钟。过滤，得到的重氮盐溶液在搅拌下滴入上制的二硒化钠溶液，加毕，升温至 60 °C，搅拌 2h，再于室温下搅拌 3h，用稀盐酸将反应液酸化，滤集得到的红色固体。该粗品溶解于碳酸钠溶液，煮沸后滤除不溶物，滤液用稀盐酸调节 pH<1，水洗，干燥，得到 2, 2'-二硒化双苯甲酸 46 g(92%)，mp: 294-296 °C(文献 295 °C)。

实施例 2 4, 4'-二氯-2, 2'-二硒化双苯甲酸的制备

实施例 1 所述的方法进行，不同在于用 4-氯邻氨基苯甲酸 3.43 g(20 mmol)，硒粉 1.72 g(21.77 mmol)代替上述的邻氨基苯甲酸，得到本标题化合物 3.17 g，收率 67.6%，mp: 295-297 °C。

实施例 3 5, 5'-二羟基-2, 2'-二硒化双苯甲酸的制备

实施例 1 所述的方法进行，不同在于用 5-羟基邻氨基苯甲酸 3.06 g(20 mmol)，硒粉 1.72 g(21.77 mmol)代替上述的邻氨基苯甲酸，得到本标题化合物 2.48 g，收率 57.4%，mp: 230-233 °C。

实施例 4 4, 4'-二氟-2, 2'-二硒化双苯甲酸的制备

实施例 1 所述的方法进行，不同在于用 4-氟邻氨基苯甲酸 2.33 g(15 mmol)，硒粉 1.5 g(38.0 mmol)代替上述的邻氨基苯甲酸，得到本标题化合物 3.00 g，收率 45.9%，mp: 286-288 °C。

实施例 5 5, 5'-二氟-2, 2'-二硒化双苯甲酸的制备

实施例 1 所述的方法进行，不同在于用 5-氟邻氨基苯甲酸 4.65 g(30 mmol)，硒粉 5.97 g(76.0 mmol)代替上述的邻氨基苯甲酸，得到本标题化合物 5.00 g，收率 38.2%，mp:285-287℃。

实施例 6 5, 5'-二氯-2, 2'-二硒化双苯甲酸的制备

实施例 1 所述的方法进行，不同在于用 5-氯邻氨基苯甲酸 10.30 g(60 mmol)，硒粉 5.21 g(76.0 mmol)代替邻氨基苯甲酸和硒粉用量，得到本标题化合物 11.68 g，收率 41.5%，mp:295-297℃。

步骤 C:

实施例 7 2,2'-氯硒苯甲酰氯的制备

2, 2'-二硒化双苯甲酸 25.3 g(63.25 mmol)与二氯亚砷 120 ml 混合，加热回流 5h，减压蒸除二氯亚砷，剩余物用石油醚 750 ml 加热溶解，活性炭脱色，滤液减压浓缩，得到橘红色固体 20 g，收率 62.0%，mp: 65℃，为本标题化合物。

实施例 8 4-氯-2-氯硒苯甲酰氯的制备

实施例 7 所述的方法进行，不同在于用 4, 4'-二氯-2, 2'-二硒化双苯甲酸 3.16 g(6.74 mmol)与二氯亚砷 10 ml 代替 2, 2'-二硒化双苯甲酸与二氯亚砷的用量，得到本标题化合物 2.8 g，收率 72%，mp: 82-86℃。

实施例 9 5-羟基-2-氯硒苯甲酰氯的制备

实施例 7 所述的方法进行，不同在于用 5, 5'-二羟基-2, 2'-二硒化双苯甲酸 2.48 g(5.74 mmol)与二氯亚砷 10 ml 代替 2, 2'-二硒化双苯甲酸与二氯亚砷的用量，得到本标题化合物 2.17 g，收率 70%，mp: 100-103℃。

实施例 10 4-氟-2-氯硒苯甲酰氯的制备

实施例 7 所述的方法进行，不同在于用 4, 4'-二氟-2, 2'-二硒化双苯甲酸 0.99g(2.27 mmol)与二氯亚砷 5 ml 代替 2, 2'-二硒化双苯甲酸与

二氯亚砷的用量，得到本标题化合物 1.19 g，收率 96.4%，油状物。

实施例 11 5-氟-2-氯硒苯甲酰氯的制备

实施例 7 所述的方法进行，不同在于用 5, 5'-二氟-2, 2'-二硒化双苯甲酸 5.00 g(11.47 mmol)与二氯亚砷 105ml 代替 2, 2'-二硒化双苯甲酸与二氯亚砷的用量，得到本标题化合物 6.24 g，收率 100%，不必分离进入下一步反应。

实施例 12 5-氯-2-氯硒苯甲酰氯的制备

实施例 7 所述的方法进行，不同在于用 5, 5'-二氯-2, 2'-二硒化双苯甲酸 5.00 g(10.66 mmol)与二氯亚砷 25ml 代替 2, 2'-二硒化双苯甲酸与二氯亚砷的用量，得到本标题化合物 4.73 g，收率 82.0%，不必分离进入下一步反应。

步骤 D:

实施例 13 2-(4-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑-3(2H)-酮的制备

4-氨基吡啶 1.0 g(10.64 mmol)，三乙胺 2.60 g(25.5 mmol)和四氢呋喃 25 ml 混合，搅拌下滴加 2-氯硒苯甲酰氯 2.7 g(10.63 mmol)的 50 ml 四氢呋喃溶液。滴毕，升温搅拌 6h，滤集生成的固体，先后用四氢呋喃、水和四氢呋喃洗涤，干燥，用 DMF/乙醇结晶，得到本标题化合物 2.32 g，收率 80%，mp:258-260°C。m/z: 276。

实施例 14 2-(3-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行，不同在于用 3-氨基吡啶 0.47g(5.0 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量，得到本标题化合物 0.88 g，收率 64.0%，mp:260-272°C。m/z: 276。

实施例 15 6-氯-2-(4-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行，不同在于用 4-氯-2-氯硒苯甲酰氯 0.4 g(1.39 mmol) 4-氨基吡啶 0.13g(1.39 mmol)以及相应的三乙胺和

四氢呋喃用量，得到本标题化合物 0.15 g，收率 35%，mp:278-280℃。
1H NMR(DMSO-d₆): δ 7.52(dd, J=1.8Hz, 6.6Hz, 1H, 6H), 7.79(d, J=6.3Hz, 2H, 3'H+5'H), 7.88(d, J=7.4Hz, 1H, 7H), 8.1(d, J=1.8Hz, 1H, 4H), 8.55(d, J=6.3Hz, 2H, 2'H+6'H)。EI-MS m/z: 310。

实施例 16 5-氯-2-(2-吡啶基)-1, 2-苯并异噻唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行，不同在于用 5-氯-2-氯噻苯甲酰氯 6.37 g(22.0 mmol) 2-氨基吡啶 2.07g(22.0 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量，得到本标题化合物 4.40 g，收率 64.7%，mp:278-280℃。1H NMR(DMSO-d₆): 1H NMR(DMSO-d₆): δ ppm 8.54(d, J=8.4Hz, 1H, ArH), 8.41dd, J=4.8,, 1H, ArH), 8.06(d, J=8.7Hz, 1H, ArH), 7.87(m, 2H' ArH), 7.71(d, d, J=2.4Hz, J=2.1Hz 1H ArH), 7.21(m, 1H, ArH), EI-MS m/z: 309。

实施例 17 5-氟-2-(2-吡啶基)-1, 2-苯并异噻唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行，不同在于用 5-氟-2-氯噻苯甲酰氯 2.70 g(9.9 mmol) 2-氨基吡啶 0.93g(9.8 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量，得到本标题化合物 1.25 g，收率 43.2%，mp:257-258.4℃。1H NMR(DMSO-d₆): δ 8.56(d, J=8.4Hz, 1H, ArH), 8.42(d, J=5.7Hz, 1H, ArH), 8.08(d, d J=3.9Hz, J=3.9Hz 1H, ArH), 7.89(t, J=7.8Hz, 1H, ArH), 7.61(m 2H, ArH), 7.22 (d, d J=4.8Hz, J=5.1Hz, 1H, Ar H), EI-MS m/z: 292。

实施例 18 5-氟-2-(3-吡啶基)-1, 2-苯并异噻唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行，不同在于用 5-氟-2-氯噻苯甲酰氯 2.70 g(9.9 mmol) 3-氨基吡啶 0.93g(9.8 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量，得到本标题化合物 1.25 g，收率 43.2%，mp:257-258.4℃。1H NMR(DMSO-d₆): δ 8.56(d, J=8.4Hz, 1H, ArH), 8.42(d, J=5.7Hz, 1H, ArH), 8.08(d, d J=3.9Hz, J=3.9Hz 1H, ArH), 7.89(t, J=7.8Hz, 1H, ArH), 7.61(m 2H, ArH), 7.22 (d, d J=4.8Hz, J=5.1Hz, 1H, Ar H), EI-MS m/z: 292。

实施例 19 5-氟-2-(4-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行, 不同在于用 5-氟-2-氯硒苯甲酰氯 1.08g(4.0mmol)4-氨基吡啶 0.38 g(4.0mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量, 得到本标题化合物 0.4g, 收率 34.2%,

mp:310-313℃。1H NMR(DMSO-d₆): δ ppm8.566(s, 1H, ArH), 8.545 (s, 1H, ArH), 8.09(d,d J=4.8Hz,J=4.8Hz 1H, ArH), 7.814(s, 1H, ArH), 7.79 (s,1 H, ArH),7.63 (m,2H,ArH),

实施例 20 5-氯-2-(4-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑 3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行, 不同在于用 5-氯-2-氯硒苯甲酰氯 1.73 g(6.0 mmol) 4-氨基吡啶 0.57 g(6.0 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量, 得到本标题化合物 1.2g, 收率 64.62%, mp:263-265℃。1H NMR(DMSO-d₆): δ ppm7.57 (d,J=1.8Hz,1H, ArH), 7.55(d, J=1.5Hz, 1H, ArH), 8.09(d,J=8.7Hz,1H,ArH), 7.87(d,J=2.1Hz,1H, ArH), 7.78 (m 3H, ArH), J=4.8Hz, 。EI-MS m/z:309。

实施例 21 6-氟-2-(4-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行, 不同在于用 4-氟-2-氯硒苯甲酰氯 1.09 g(4.0 mmol) 4-氨基吡啶 0.38 g(4.0 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量, 得到本标题化合物 0.365 g, 收率 31.0%, mp:269-270℃。1H NMR(DMSO-d₆): δ 。EI-MS m/z : 293。

实施 22 6-氯-2-(3-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行, 不同在于用 4-氯-2-氯硒苯甲酰氯 0.4 g(1.39 mmol) 3-氨基吡啶 0.13g(1.39 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量, 得到本标题化合物 0.32 g, 收率 74.4%, mp:292-294℃。1H NMR(DMSO-d₆): δ 7.50(dd,J=4.9Hz, 3.3Hz, 1H, 5H), 7.54(dd, J=1.8,J=6.6Hz, 1H, 6H), 7.88(d, J=8.1Hz, 1H, 7H), 8.04(d, J=8.1Hz, 1H, 4'H), 8.13(d, J=1.8Hz, 4H), 8.45(d, J=4.8Hz, 1H, 6'H), 8.85(d, J=2.7Hz, 1H,2'H)。EI-MS m/z: 310。

实施例 23 6-氯-2-(2-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行, 不同在于用 4-氯-2-氯硒苯甲酰氯 0.4 g(1.39 mmol) 2-氨基吡啶 0.13g(1.39 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量, 得到本标题化合物 0.30 g, 收率 70%, mp:278-280℃。¹H NMR(DMSO-d₆): δ 7.22(m, 1H, 4'H), 7.51 (dd, J=1.9Hz,J=6.6, 1H, 3'6H), 7.88(m, 2H, 7H+5'H), 8.10(d, J=1.8Hz, 1H, 4H), 8.41(m, 1H, 1H,3'H), 8.56(d, J=7.5Hz, 1H, 6'H)。EI-MS m/z: 310。

实施例 24 5-羟基-2-(4-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行, 不同在于用 5-羟基-2-氯硒苯甲酰氯 0.4 g(1.48 mmol) 4-氨基吡啶 0.139g(1.48 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量, 得到本标题化合物 0.087 g, 收率 20%, mp:>310℃。¹H NMR(DMSO-d₆): δ 7.17(dd,J=2.7Hz, 6Hz, 1H, 5H), 7.28(d, J=2.4Hz, 1H, 4H), 7.80(d, J=6.3Hz, 2H, 3'H+5'H), 7.83(d, J=5.7Hz, 1H, 7H), 8.52(d, J=6.3Hz, 2H, 2'H+6'H),9.92(s, 1H,OH)。EI-MS m/z: 292。

实施例 25 5-羟基-2-(2-吡啶基)-1, 2-苯并异硒唑-3(2H)-酮的制备

实施例 13 所述的方法进行, 不同在于用 5-羟-2-氯硒苯甲酰氯 0.4 g(1.48 mmol) 2-氨基吡啶 0.139g(1.48 mmol)以及相应的三乙胺和四氢呋喃用量, 得到本标题化合物 0.18 g, 收率 42%, mp:270-272℃。¹H NMR(DMSO-d₆): δ 7.23(dd,J=6.6Hz,J=2.1Hz,1H, 4'H), 7.61(dd, J=2.4Hz,J=6.3, 1H, 5H), 7.73(d, J=2.7Hz, 1H, 3'4H), 7.89(m,1H, 5'H), 8.13(d, J=8.7Hz, 1H, 7H),8.42(d, J=5.1Hz, 1H,3'H), 8.54(d, J=8.4Hz, 1H,6'H)。

EI-MS m/z: 292。

药物试验

实验例 1 细胞水平实验

实验动物

雄性豚鼠，体重 250~280 g，由中国医学科学院动物中心提供。

药品配置

无钙液 (Ca^{2+} -free solution) 成分 (mM): NaCl 90, KCl 10, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 5, NaHCO_3 15, taurine 30, glucose 20, 用 1N 的 NaOH 调 pH 值至 7.4

正常台氏液 (normal Tyrode's solution) 成分 (mM): NaCl 150, KCl 5.4, MgCl_2 2, CaCl_2 1.8, HEPES 5, Glucose 10, 用 1N NaOH 调 pH 值至 7.35

记录 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流的台氏液成分 (mM): NaCl 140, MgCl_2 2, CaCl_2 1.8, HEPES 5, Glucose 10, 用 1N CsOH 调 pH 值至 7.4

正常电极液 (normal pipette solution) 成分 (mM): KCl 140, MgCl_2 0.5, EGTA 10, HEPES 10, 1 N KOH 调 pH 值至 7.2

记录 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流的电极液成分 (mM): EGTA 42, CaCl_2 29, MgCl_2 13, Aspartic acid 42, TEA 20, HEPES 5, Na_2ATP 5, 1N 的 CsOH 调 pH 至 7.4。实验时，根据电极内液中不同的 Na^+ 浓度，分别加入 NaCl 5, 15 和 25 mM，使电极液中的 Na^+ 浓度达到所要求的 15, 25 和 35 mM。

所有溶液均用双蒸水配制，无钙液和台氏液每次用时新鲜配制，电极内液配好后，用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤，分装于 Eppendorf 管，冻存储用。

单个豚鼠心室肌细胞的制备：把豚鼠击昏、颈动脉放血后，迅速开胸，取出心脏，在 4 °C 无钙液 (Ca^{2+} -free solution) 中去除脂肪组织和心包膜，进行 Langendorff 灌流。灌流具体过程：首先用无钙液经主动脉逆行灌流 6 min，使心脏内的残血彻底排尽，心脏膨大，呈粉红色时再用含有链霉蛋白酶 E (pronase E) 0.1 mg/ml, 脱脂牛血清白蛋白 (BSA) 0.5 mg/ml, Ca^{2+} 浓度为 150 μM 的无钙液 (酶液) 灌流 2~3 min，至心脏完全膨大松软后停止灌流。去除心房，将心室肌剪碎，用酶液 37 °C 温孵搅拌 5~10 min，倒出上清液，用无钙液稀释 5 倍，

其中含有 BSA 0.5 mg/ml, Ca^{2+} 浓度为 1.8 mM, 室温下 (20~24 °C) 静置 1 h 后开始实验。在整个灌流过程中, 压力维持在 70 cm 水柱, 37 °C 恒温, 持续通 95 % 的 O_2 和 5 % 的 CO_2 混合气。

膜片钳全细胞记录:

选取杆状、横纹清晰、膜良好的细胞进行实验。细胞池体积约 1 ml, 平放在连有微操纵器 (MO-303) 的倒置显微镜 (Olympus IMT-2) 上, 细胞充分贴壁后, 用台氏液 (Tyrode's solution) 灌流, 速度约为 1~2 ml/min。电极用玻璃毛细管(中科院上海脑所)经微电极拉制仪 (PP-83) 分两步拉制, 充灌电极液后电阻为 2~4 M Ω 。膜片钳全细胞记录过程中, 刺激脉冲的产生和信号采集均由 pCLAMP5.5.1 软件 (Axon Instrument) 完成, 离子通道电流通过膜片钳放大器 (L/M EPC-7) 放大, 经 AD/DA 转换板 (Axon TL-1) 输入计算机。

记录 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流 ($\text{I}_{\text{Na-Ca}}$) 时, 细胞钳制在 -40 mV, 给予从 +60 mV 复极化至 -100 mV、速度为 80 mV/s 持续 2 s 的反向斜坡脉冲 (declining ramp pulse), 刺激频率为 0.05 Hz。由于刺激形式是缓慢复极化的斜坡脉冲, 因此细胞膜电容和串联电阻无需补偿。同时, 为了减少其它电流成分的干扰, 实验时台氏液中加入: ouabain 20 μM 以阻断生电性 Na^+ - K^+ -ATP 酶; BaCl_2 1 mM 和 CsCl_2 2 mM 阻断钾离子通道电流; verapamil 1 μM 阻断 L 型钙电流; 电极内液中 20 mM 的 TEA 也可以阻断钾离子通道电流。电极内液中高浓度的 EGTA (42 mM) 和 CaCl_2 (29 mM) 根据 Fabiato & Fabiato 公式计算得胞内游离 Ca^{2+} 浓度为 153 nM。生电性的双向 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流可被细胞外高浓度的 Ni^{2+} (2 或 5 mM) 特异性阻断, 用 Ni^{2+} 前后的电流相减所得的电流曲线即 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流 ($\text{I}_{\text{Na-Ca}}$)。为了排除因细胞体积大小不同而对电流值造成的影响, 我们用电流密度 (pA/pF) 来表示电流值的大小, 所有实验均在 31 °C~32 °C 之间进行。

统计学分析

用 pCLAMP 5.5.1 和 pCLAMP 6.0.1 软件对原始电流图进行测量分析, 所有数据均为 Mean \pm SE 表示, n 表示细胞数; 配对和组间 t

检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

1 正常 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流的记录

将细胞钳制在 -40 mV , 先去极化至 $+60 \text{ mV}$, 再给以持续 2 s 速度为 80 mV/s 的反向斜坡刺激, 复极化至 -100 mV , 刺激频率为 0.05 Hz 。在该刺激条件下, 用台氏液灌流时, 记录到一个由外向到内向的电流-电压关系曲线 ($I\text{-}V$ curve), 由于其它时间依赖性的电流都被阻断, 因此记录到的电流几乎呈线性[14, 23, 28]。在细胞外应用 5 mM 的 Ni^{2+} 时, 该电流的外向成分和内向成分显著减小, 用 Ni^{2+} 前后记录到的两条电流-电压曲线相减, 得到对 Ni^{2+} 敏感的电流即生电性 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流 (Na^+ - Ca^{2+} exchange current, $I_{\text{Na-Ca}}$)

2. Amiloride、KB-R7943 和 SZA 对 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流的抑制作用的比较

电极内液中的 Na^+ 浓度是 25 mM 时, 形成全细胞记录后, 通过离子交换作用使细胞内 Na^+ 增加, 激活 Na^+ - Ca^{2+} 交换体的反向转运方式, 使 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的外向成份显著增加, 于 3 min 左右达到最大, 持续 5 min 未见“衰减”(run-down)现象。此时, 在灌流液中加入 Na^+ - H^+ 交换抑制剂 Amiloride $10, 30$ 和 $100 \mu\text{M}$, KB-R7943 1 和 $10 \mu\text{M}$, SZA $0.1, 1$ 和 $10 \mu\text{M}$, 比较三者对 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的抑制作用。

在 $+50 \text{ mV}$ 时, Amiloride $10, 30$ 和 $100 \mu\text{M}$ 对 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的抑制率分别是 15% , 23% 和 41% , -80 mV 时的抑制率则分别是 6% , 15% 和 23% , 说明 Amiloride 对外向 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的抑制作用更明显。在 $+50 \text{ mV}$ 时, KB-R7943 1 , 和 $10 \mu\text{M}$ 对 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的抑制率分别是 29% 和 61% , -80 mV 时的抑制率则分别是 22% 和 57% , 说明 KB-R7943 在双向离子条件下对内、外向 $I_{\text{Na-Ca}}$ 无选择性。SZA $0.01, 1$ 和 $10 \mu\text{M}$, 对外向 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的抑制率在 $+50 \text{ mV}$ 时分别是 28% , 48% 和 66% , 对内向 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的抑制率在 -80 mV 时则分别是 15% , 24% 和 42% , 说明 SZA 对外向 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的抑制作用明显强于其对内向 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的抑制作用。

3. 本发明化合物对心肌 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流的作用比较及筛选

因为 SZA 比 KB-R7943 和 Amiloride 选择性更高, 抑制外向 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交换电流作用更强, 我所药化室以 SZA 为母核, 合成了多个化合物, 用上述膜片钳方法, 建立胞内 Na^+ 负荷模型、激活 INa-Ca , 以 SZA 为阳性对照药, 比较这些化合物对 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交换电流的抑制作用, 以期找到比 SZA 更好的选择性作用于外向 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交换电流的化合物。结果见表 1

表 1. 10 个本发明化合物对 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交换电流的抑制作用

化合物归档号	n	外向 INa-Ca 抑制率(%)	内向 INa-Ca 抑制率(%)
实施例 15	3	50*	28
实施例 16	3	52*	44
实施例 17	5	43*	21
实施例 18	3	44*	42
实施例 19	3	59*	57*
实施例 20	3	44*	14
实施例 22	4	电流增大 5%	2
实施例 23	3	46	57
实施例 24	3	电流增大 14%	电流增大 35%
实施例 25	4	14	19

* $P < 0.05$

在本发明的 10 个化合物中, 经电生理(心肌细胞水平)筛选, 找到 7 个活性更高的化合物, 它们对外向 Na-Ca 交换的抑制作用强于内向抑制, 具有特异性, 抑制率 40% 以上的为作用较强化合物, 作用最强的化合物活性接近 60%。见下表。

化合物代号	外向 INa-Ca 抑制率(%)	内向 INa-Ca 抑制率(%)
实施例 15	50	28
实施例 16	52	44

实施例 17	43	21
实施例 18	44	42
实施例 19	59	57
实施例 20	44	14

实验例 2 离体心脏缺血再灌实验：

根据前期电生理细胞模型筛选的结果，从本发明化合物中，经对 Na/Ca 交换反向转运产生的外向电流的抑制率的比较，挑选出6个活性相对较高的化合物进行离体实验，即结构式中含氯元素的实施例15，实施例16，实施例20；结构式中含氟元素的实施例17，实施18，实施例19。实验采用大鼠离体心脏缺血再灌注（I/R）损伤模型。以心律失常的持续时间，室早，室速和室颤的发生率作为心肌损伤的指标，观察化合物的心肌保护作用。结果如表所示：

化合物 (10-6M)	n	时间(min)	发生率(%)		
		AAT	VPS	VT	VF
对照	13	28.23±1.70	62	69	77
实施例 15	10	1.67±0.70**	20*	30	30*
实施例 16	8	0.70±0.33**	37.5	37.5	0**
实施例 17	8	19.72±4.42	50	62.5	38
实施例 18	8	22.10±3.49	25	50	50
实施例 19	8	23.67±3.87	37.5	75	63
实施例 20	7	29.13±0.69	28.6	85.7	85.7

AAT: 出现时间

VPS: 室性早搏次数

VT: 室速

VF: 室颤

*p<0.05, **p<0.01 与对照组比较

结论：实施例 15 和实施例 16 在浓度为 10^{-6} 时，有显著心肌保护作用。

实验例 3: 大鼠静脉注射给药

大鼠静脉注射 3mg/kg 上述化合物, 对冠状动脉缺血再灌注损伤有明显的保护作用。以心脏损伤后出现心律失常的程度作为评价指标, 如表 3。

表 3 静脉注射 N-取代吡啶基苯并异噻唑酮类化合物对麻醉大鼠心脏缺血-再灌注心律失常的保护作用

组别	n	出现时间(s)	持续时间(s)	VT		VF		VE
				发生率(%)	持续时间(s)	发生率(%)	持续时间(s)	发生率(%)
对照	14	4.0±4.1	23.0±10.7	100	8.2±6.1	35.7	3.3±5.7	100
维拉帕米 (0.3mg/Kg)	11	29.1±29.7*	11.8±12.1*	54.5**	5.4±7.0	0*	0*	63.6*
实施例 13 (3mg/Kg)	9	13.2±18.2	11.8±9.1*	66.7*	3.8±3.6*	0*	0*	88.9
实施例 16 (3mg/Kg)	12	20.8±24.2*	16.1±12.1	66.7*	3.8±4.0*	0*	0*	75*
实施例 15 (3mg/Kg)	8	7.0±8.2	24.0±16.5	87.5	5.9±7.5	25	2.2±4.4	100
实施例 17 (3mg/Kg)	11	12.4±10.0*	18.5±8.9	72.7*	3.8±2.9*	0*	0*	100

VT: 室速

VF: 室颤

VE: 室早

*P<0.05, **P<0.01 与对照组比较

实验例 4 大鼠口服给药

大鼠口服给药 10—30mg/kg 上述化合物, 对冠状动脉缺血再灌注损伤有明显的保护作用。以心脏损伤后出现心律失常的程度作为评价指标, 如表 4。

实验例 16、17 的化合物溶于乙醇：PEG（体积比）=1：9 的溶剂中，并以该溶剂为对照组，灌胃容积均为 10ml/Kg，灌胃后 60min 时结扎冠状动脉左前降支造成心脏缺血，15min 后实现再灌注。

1) 实验例 16

口服 30mg/Kg，可显著性缩短缺血-再灌注心律失常($P<0.01$)的持续时间，降低 VT ($P<0.01$) 和 VF ($P<0.05$) 的发生率，缩短 VT ($P<0.01$) 的持续时间。

口服 100mg/Kg，可显著性缩短缺血-再灌注心律失常($P<0.05$)的持续时间，降低 VT ($P<0.05$) 的发生率，缩短 VT ($P<0.01$) 的持续时间。

2) 实验例 17

口服 10mg/Kg，可显著性缩短 VT ($P<0.05$) 的持续时间。

口服 30mg/Kg，可显著性缩短缺血-再灌注心律失常($P<0.01$)的持续时间，降低 VF ($P<0.05$) 的发生率，缩短 VT ($P<0.01$) 和 VF ($P<0.05$) 的持续时间。

口服 100mg/Kg，可显著性降低 VT ($P<0.05$)，缩短 VT ($P<0.01$) 的持续时间。

大鼠口服给药 10、30、100mg/kg 上述化合物，对冠状动脉缺血再灌注损伤有明显的保护作用。以心脏损伤后出现心律失常的程度作为评价指标，如表 4。

表 4 口服实施例 16 和实施例 17 对麻醉大鼠心脏缺血—再灌心律失常的保护作用

组别 (mg/Kg)	n	出现时间 (s)	持续时间 (s)	VT		VF		VE
				发生 率(%)	持续时间 (s)	发生 率 (%)	持续时 间(s)	发生 率 (%)
对照	17	5.0±6.7	41.6±15.2	94.1	15.4±11.9	52.9	3.9±7.0	94.1
实施例 16 (10mg/Kg)	9	9.3±10.0	30.2±17.6	88.9	8.8±7.4	22.2	4.7±12.9	100
实施例 16 (30mg/Kg)	9	19.6±24.1	17.0±12.6**	44.4**	3.3±5.7**	11.1 *	0.4±1.3	66.7
实施例 16 (100mg/Kg)	9	16.4±25.1	22.7±19.4*	55.5*	3.9±6.8**	33.3	5.5±10.2	66.7
实施例 17 (10mg/Kg)	9	15.5±21.5	32.1±26.1	66.7	6.6±7.2*	22.2	2.5±6.4	100
实施例 17 (30mg/Kg)	9	9.6±9.2	18.0±11.4**	66.7	3.2±5.5**	11.1 *	0.2±0.5*	100
实施例 17 (100mg/Kg)	9	9.0±19.7	31.1±21.3	44.4**	5.1±7.8*	22.2	2.2±6.3	88.9

结论：以上实验证明，该类化合物静脉注射和口服，对心脏缺血损伤均有保护作用。

实验例 5：急性毒性实验

以实施例 16 和实施例 17 化合物进行了急性毒性实验，选雄性昆明种小鼠，由中国医学科学院动物中心提供，体重 $19 \pm 2\text{g}$ 。于动物房适应环境，实验前 14 小时禁食后随机分成 2 组，每组 10 只动物。口服给药 30min 后，大剂量组动物活动减少。24h 后，各剂量组动物恢复正常。观察 7 天，结果如表 5

表 5 急性毒性实验

化 合 物 浓 度	动 物 死 亡 数	
	实施例 16	实施例 17
200mg/kg	--	--
350mg/kg	--	--
500mg/kg	--	--
700mg/kg	--	--
1g/kg	--	--
2g/kg	--	--
3g/kg	--	--
5g/kg	--	7

结论：实施例 16 各剂量组未见动物死亡，半数致死量 $LD_{50} > 5g/kg$ ，提示此类化合物毒性较低。